研究用

TaKaRa

EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool

説明書

EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool は、EpiScope™ Promoter qPCR Array（Human）（製品コード 5301）で得られたデータを解析するためのツールで、Ct 値を入力するだけで自動的に解析を行いグラフ化することができます。96 ウェルプレート 2 枚分のデータを入力でき、1 ～ 3 セットの Input および Bound データ、または 1 ～ 3 セットの Unbound および Bound データに対応しています。

＊ EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool は、Microsoft® Office Excel® で作成されたマクロを含むファイルです。このファイルは、以下のバージョンのオペレーションシステム（OS）および Microsoft® Office Excel® で正常に動作することを確認しています。
Windows® XP operating system
Microsoft® Office Excel® 2003
Microsoft® Office Excel® 2007
＊ 本解析ツールは、タカラバイオウェブサイトからダウンロードしてご利用ください。
URL：http://www.takara-bio.co.jp/qpcr-array_tool/

I. Ct 値の算出と出力

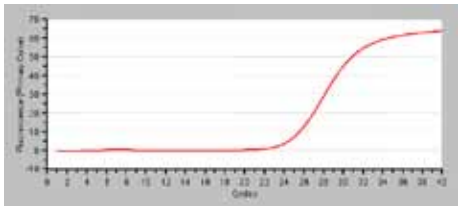
リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで解析パラメーターを設定し、Ct 値を算出します。（操作方法の詳細は、各リアルタイム PCR 解析ソフトウェアの取扱説明書をご参照ください。）

（1）解析パラメーターの設定

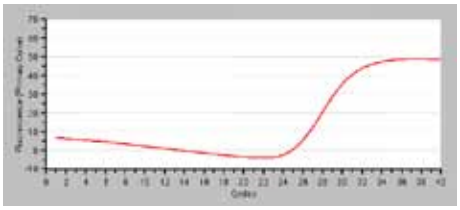
ほとんどのリアルタイム PCR 解析ソフトウェアでは解析パラメーターが自動で設定されますが、まず、その設定が正しいことを確認し、適切でない場合にはマニュアルで設定し直してください。

ベースライン領域

増幅曲線が立ち上る手前のフラットな範囲をベースライン領域として設定します。ベースライン領域が狭すぎる場合、十分なベースライン補正がなされません。逆に、ベースライン領域が広すぎると右下がりの増幅曲線になるなど、正しく補正されないことがあります。



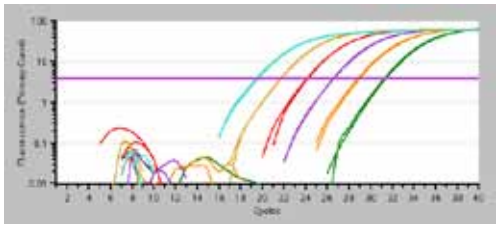
正しくベースラインが設定された例



ベースライン領域が広すぎる例

Threshold（閾値）

PCR の指数関数的増幅域に設定します。増幅曲線の縦軸を対数（Log scale）で表示した際に増幅曲線が直線になる範囲が指数関数的増幅域に相当します。



正しく Threshold（閾値）が設定された例

（2）Ct 値の算出
Ct 値はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアにより自動的に算出されます。

（3）データの出力
Ct 値を Microsoft® Office Excel® または CSV などの形式で出力します（出力形式はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアによって異なります）。

※ リアルタイム PCR 解析ソフトウェアによっては、サンプル情報が設定されていないウェルや解析から除外（Omit）したウェルのデータ行は出力されないことがあります。そのような状態では、EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool へのデータ入力の際に誤りが生じやすくなりますので、全ウェルのデータが表示される状態で出力を行ってください。

II. 定量解析

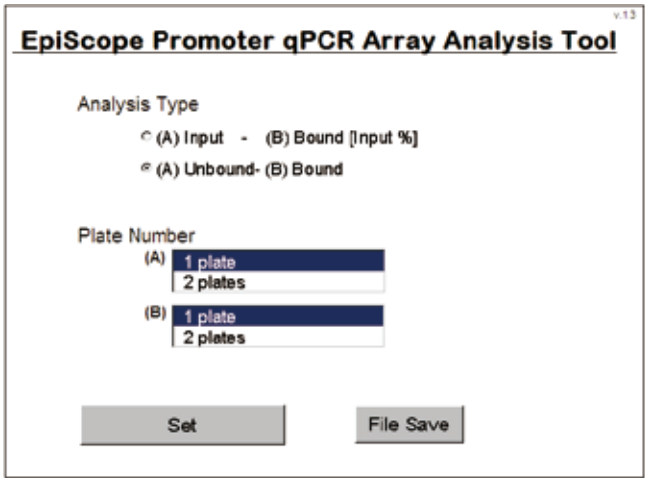
EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool を用いて定量解析を行います。

1. EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool の起動
EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool のファイル（episcope_promoter_qpcrarray_analysis_tool_v1.xls）を開きます。

2. Analysis Setting
解析方法とプレート枚数の設定を行います。

（1） Analysis Type の選択
インプット%を算出する場合は「（A） Input －（B） Bound [Input %]」を、非結合画分と結合画分を比較する場合は「（A） Unbound －（B） Bound」を選択します。（解析方法の詳細は、EpiScope™ Promoter qPCR Array 説明書の「IV-4. データ解析法」をご参照ください。）
（2） Plate Number の選択
（A）、（B）のサンプルそれぞれにつき、リアルタイム PCR に使用したプレートの枚数を選択します。
設定が完了したら、Set ボタンをクリックします。

＊ Set ボタンをクリックすると、"Data will be deleted." というメッセージが表示されます。以前に入力したデータを保存する必要がある場合には、キャンセルボタンをクリックし、ファイルを別名で保存して下さい。



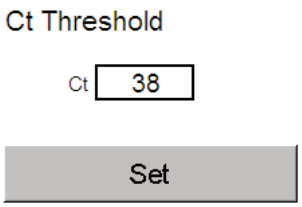
3. Data
"Enter the Ct values, and click Set." というメッセージが表示されますので、OK をクリックして操作に進みます。

（1） Data の入力
Data シートに各サンプルの Ct 値を入力します（リアルタイム PCR 解析ソフトウェアから出力した Ct 値をコピー＆ペーストすると簡単に入力できます）。

（2） Ct Threshold の設定
Ct 値の Threshold を設定すると、一定以上の Ct 値のデータを解析から除外することができます。デフォルトでは 35 サイクルに設定されており、Ct 値が 35 以上のデータは解析から除外されます。必要に応じて、数値を変更して下さい。

入力が完了したら、Set ボタンをクリックします。

No	Well	Unbound Ct(plate1)	Bound Ct(plate1)
1	A01	--	--
2	A02	--	--
3	A03	27.08	27.08
4	A04	27.79	27.79
5	A05	25.3	25.3
6	A06	26.44	26.44
7	A07	31.2	31.2
8	A08	28.06	28.06
9	A09	33.1	33.1
10	A10	26.3	26.3



4. Plate Setting
各サンプルにつき、リアルタイム PCR を行った際の Primer 配置を設定します。
EpiScope Promoter qPCR Array（Human）primer information（Symbol）の表の情報を下の表にコピー＆ペーストして下さい。
入力が完了したら、Set ボタンをクリックします。

EpiScope Promoter qPCR Array (Human) primer information (Symbol)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1_APC	9_CDH1	17_FHIT	25_RASSF1	1_APC	9_CDH1	17_FHIT	25_RASSF1	1_APC	9_CDH1	17_FHIT	25_RASSF1
B	2_APC	10_CDKN2A	18_GSTP1	26_RASSF1	2_APC	10_CDKN2A	18_GSTP1	26_RASSF1	2_APC	10_CDKN2A	18_GSTP1	26_RASSF1
C	3_BNIP3	11_CDKN2A	19_LOX	27_RB1	3_BNIP3	11_CD	Replicat 1	27_RB1	3_BNIP3	11_CD	Replicat 2	27_RB1
D	4_BRCA1	12_CDKN2B	20_MGMT	28_SFRP1	4_BRCA1	12_CD		28_SFRP1	4_BRCA1	12_CD		28_SFRP1
E	5_CADM1	13_CHFR	21_MLH1	29_VHL	5_CADM1	13_CHFR	21_MLH1	29_VHL	5_CADM1	13_CHFR	21_MLH1	29_VHL
F	6_CCNA1	14_DAPK1	22_PTGS2	30_WT1	6_CCNA1	14_DAPK1	22_PTGS2	30_WT1	6_CCNA1	14_DAPK1	22_PTGS2	30_WT1
G	7_CCNA1	15_DKK3	23_RARB	31_LINE-1	7_CCNA1	15_DKK3	23_RARB	31_LINE-1	7_CCNA1	15_DKK3	23_RARB	31_LINE-1
H	8_CCND2	16_ESR1	24_RASSF1	32_GAPDH	8_CCND2	16_ESR1	24_RASSF1	32_GAPDH	8_CCND2	16_ESR1	24_RASSF1	32_GAPDH

Unbound Plate1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A							1_APC	9_CDH1	17_FHIT	25_RASSF1		
B							2_APC	10_CDKN2A	18_GSTP1	26_RASSF1		
C							3_BNIP3	11_CDKN2A	19_LOX	27_RB1		
D							4_BRCA1	12_CDKN2B	20_MGMT	28_SFRP1		
E							5_CADM1	13_CHFR	21_MLH1	29_VHL		
F							6_CCNA1	14_DAPK1	22_PTGS2	30_WT1		
G							7_CCNA1	15_DKK3	23_RARB	31_LINE-1		
H							8_CCND2	16_ESR1	24_RASSF1	32_GAPDH		

Bound Plate1

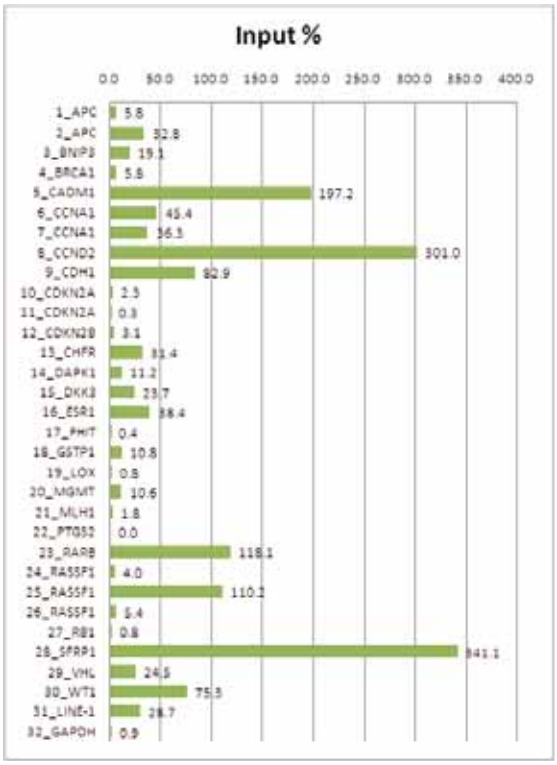
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			1_APC	9_CDH1	17_FHIT	25_RASSF1						
B			2_APC	10_CDKN2A	18_GSTP1	26_RASSF1						
C			3_BNIP3	11_CDKN2A	19_LOX	27_RB1						
D			4_BRCA1	12_CDKN2B	20_MGMT	28_SFRP1						
E			5_CADM1	13_CHFR	21_MLH1	29_VHL						
F			6_CCNA1	14_DAPK1	22_PTGS2	30_WT1						
G			7_CCNA1	15_DKK3	23_RARB	31_LINE-1						
H			8_CCND2	16_ESR1	24_RASSF1	32_GAPDH						

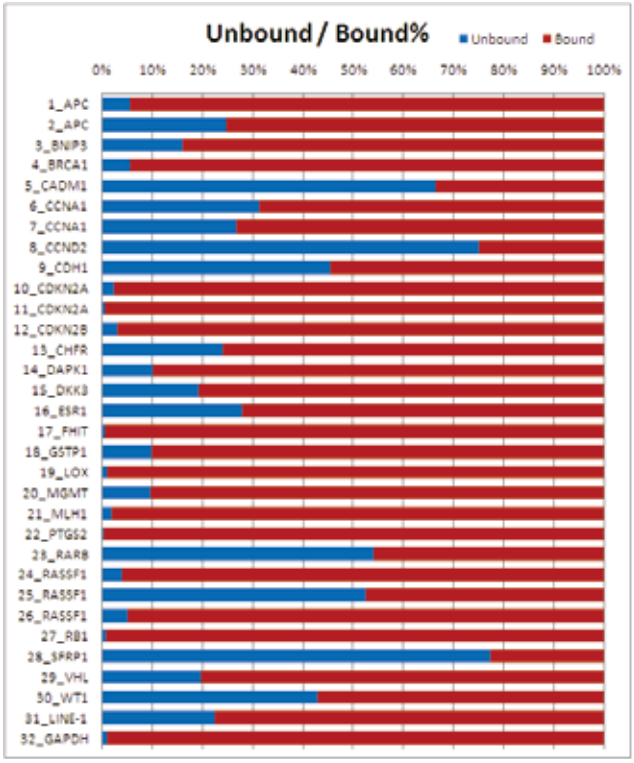
Set

5. Calculation
   Calculation シートに解析結果の数値が表示されます。

Symbol	GeneID	RefSeq	Unbound			Bound			Unbound			Bound			Unbound	Bound	Unbound%	Bound%
			Ct(1)	Ct(2)	Ct(3)	Ct(1)	Ct(2)	Ct(3)	Qty(1)	Qty(2)	Qty(3)	Qty(1)	Qty(2)	Qty(3)	Qty (Ave)	Qty (Ave)		
1_APC	324	NM_001127510	31.2			27.88			4.1E-10			7.0E-09			4.1E-10	7.0E-09	5.4	94.6
2_APC	324	NM_001127511	27.84			26.33			3.9E-09			1.2E-08			3.9E-09	1.2E-08	24.7	75.3
3_BNIP3	664	NM_004052	28.68			25.5			2.5E-09			1.2E-08			2.5E-09	1.2E-08	16.0	84.0
4_BRCA1	672	NM_007297	33.52			29.42			5.5E-10			1.9E-08			5.5E-10	1.9E-08	5.5	94.5
5_CADM1	23705	NM_001098617	27.3			28.18			6.6E-09			3.3E-09			6.6E-09	3.3E-09	66.4	33.6
6_CCNA1	8900	NM_003914	27.93			26.79			3.9E-09			8.5E-09			3.9E-09	8.5E-09	31.2	68.8
7_CCNA1	8900	NM_001111045	27.85			26.39			4.1E-09			1.1E-08			4.1E-09	1.1E-08	26.7	73.3
8_CCND2	894	NM_001759	28.39			29.88			2.8E-09			9.4E-10			2.8E-09	9.4E-10	75.1	24.9
9_CDH1	999	NM_004360	28.06			27.79			3.1E-09			4.2E-09			3.1E-09	4.2E-09	46.2	54.7
10_CDKN2A	1029	NM_000077	32.22			28.77			2.0E-10			6.7E-09			2.0E-10	6.7E-09	2.2	97.8
11_CDKN2A	1029	NM_058195	33.65			28.49			7.4E-11			2.1E-09			7.4E-11	2.1E-09	0.2	99.7
12_CDKN2B	1030	NM_004936	31.93			29.85			4.4E-10			1.4E-08			4.4E-10	1.4E-08	3.0	97.0
13_CHFR	55743	NM_001144744	29.87			28.4			3.0E-09			1.1E-08			3.0E-09	1.1E-08	22.6	76.1
14_DAPK1	1612	NM_004938	33.14			29.88			8.5E-10			7.0E-09			8.5E-10	7.0E-09	10.1	89.9
15_DKK3	27122	NM_013253	28.72			26.64			2.3E-09			9.5E-09			2.3E-09	9.5E-09	19.1	80.9
16_ESR1	2099	NM_000125	27.65			26.27			4.7E-09			1.2E-08			4.7E-09	1.2E-08	27.8	72.2
17_FHIT	2272	NM_002012	33.1			25.3			1.1E-10			2.4E-08			1.1E-10	2.4E-08	0.4	99.6
18_GSTP1	2950	NM_000852	29.2			25.99			1.1E-09			1.0E-08			1.1E-09	1.0E-08	9.8	90.2

6. Graph
   グラフは、Graph シートに表示されます。





以上で解析は終了です。他のデータの解析を行う場合には、必要に応じてファイルを別名保存し、再度、上述の操作を繰り返して下さい。

III. トラブルシューティング

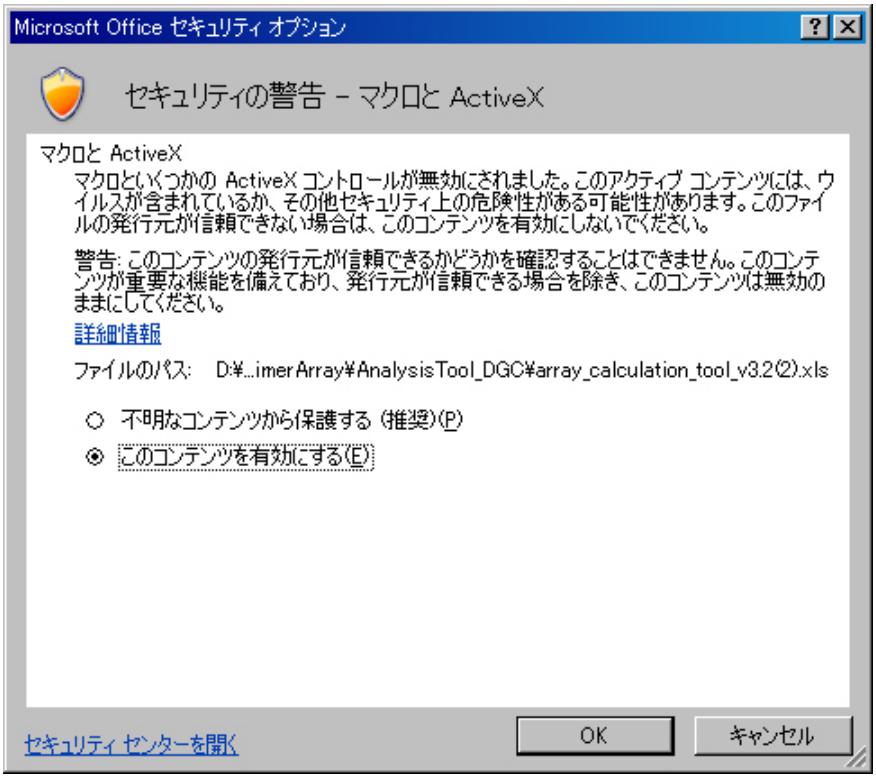
● セキュリティの警告が表示される

EpiScope™ Promoter qPCR Array Analysis Tool はマクロを含んでいるため、セキュリティの警告が表示されることがあります。その場合には、マクロを有効にする操作を行ってください。

Microsoft® Office Excel® 2007 の場合

（1）セキュリティの警告のオプションをクリックする。

（2）「このコンテンツを有効にする」を選択して、OK ボタンをクリックする。



製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

201001